

Am

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-257347

(P2005-257347A)

(43) 公開日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/50

GO 1 N 33/50

Z N A Z

2 G O 4 5

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/02

4 B O 6 3

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

4 C O 8 4

GO 1 N 33/15

GO 1 N 33/15

Z

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

D

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-66595 (P2004-66595)

(22) 出願日 平成16年3月10日(2004.3.10)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成15年11月
5日 日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会・学術集
会記録 第33巻」に発表

(71) 出願人 503360115

独立行政法人科学技術振興機構
埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(74) 代理人 100079049

弁理士 中島 淳

(74) 代理人 100084995

弁理士 加藤 和詳

(74) 代理人 100085279

弁理士 西元 勝一

(74) 代理人 100099025

弁理士 福田 浩志

(74) 代理人 100118072

弁理士 醍醐 美知子

(72) 発明者 後飯塚 僚

東京都文京区千駄木2-48-4-705

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗癌剤のスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 抗癌剤として使用可能な優れた免疫賦活物質を得る。

【解決手段】 抗癌性物質のスクリーニング方法であって、M I S T分子とF g r分子との会合状態を阻害する会合阻害物質を選択する。ここで前記選択は、M I S T分子のC末端側プロリンリッチ領域におけるF g r分子の会合を阻害する物質を選択するもの又は、F g r分子のS H 3ドメインにおけるM I S T分子の会合を阻害する物質を選択するものであってもよい。また、前記会合阻害物質が、M I S T分子のC末端側プロリンリッチ領域に結合するアミノ酸であることが好ましい。また選択が、細胞内カルシウム濃度の上昇に基づいて行われることが好ましい。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗癌性物質のスクリーニング方法であって、
M I S T 分子と F g r 分子との会合状態を阻害する会合阻害物質を選択すること
を特徴とするスクリーニング方法。

【請求項 2】

前記選択が、M I S T 分子の C 末端側プロリンリッチ領域における F g r 分子の会合を阻
害する物質を選択するものであることを特徴とする請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】

前記選択が、F g r 分子の S H 3 ドメインにおける M I S T 分子の会合を阻害する物質を
選択するものであることを特徴とする請求項 1 記載のスクリーニング方法。 10

【請求項 4】

前記会合阻害物質が、M I S T 分子の C 末端側プロリンリッチ領域に結合するアミノ酸で
あることを特徴とする請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

前記選択が、細胞活性化に基づく指標物質の測定を含むことを特徴とする請求項 1 記載の
スクリーニング方法。

【請求項 6】

前記指標物質が、細胞内カルシウム又はインターフェロン γ であることを特徴とする請求
項 5 記載のスクリーニング方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗癌剤のスクリーニング方法に関し、特に、免疫賦活効果のある抗癌剤をス
クリーニングするスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来の抗癌剤の多くは、抗癌活性を有するものの免疫抑制や造血障害などの強い副作用
を持ち、これに対して、抗癌治療に併用される免疫賦活剤は、副作用が少ないが効果が弱
いという問題点があった。このため、強い抗癌活性を有すると共に副作用が少ない有効な
抗癌剤に対する社会的な要請は依然として強い。このような抗癌剤の開発を行うにあたり
、抗癌剤についてはその癌細胞選択性の問題があり、免疫賦活薬剤についてはその作用機
序の解明が急がれているのが現状である。中でも特に、副作用の問題が少なく、自己治療
能力を回復させる免疫賦活薬剤の開発が急務となっている。

一方、細胞の表面ないしは内部に存在する種々のシグナル伝達分子によって、様々な細
胞活性が生じることが知られている。特に、複雑な免疫反応の作用機序の解明から免疫反
応に関与するいくつかの特異的な分子が同定された。

そのような分子としては、B 細胞系列に特異的に発現するアダプター分子、B A S H が
挙げられる（非特許文献 1）。この B A S H は、T 細胞で発現する S L P - 7 6（非特許
文献 2）と分子構造的に類似しており、その構造及び機能解析を通じて、血球系列・免疫
レセプターに特異的なシグナル伝達分子ファミリーが存在することを示している。 40

また、I 型アレルギー反応に関する分子機構の解明から、高親和性 I g E レセプターを
介したマスト細胞の脱顆粒に関与するシグナル伝達機構が明らかにされつつあり、その中
で、M I S T 分子が同定された（特許文献 1）。

【非特許文献 1】J. Immunol., (1998) 161:5804-5808

【非特許文献 2】J. Biol. Chem., (1995) 270:7029-7032

【特許文献 1】特開 2001-78780 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

このように分子レベルの研究が進んでいるにもかかわらず、抗癌剤として使用可能なシグナル伝達関連分子の特定は充分でなく、免疫賦活薬剤の開発に結びつくような有効な分子は特定されていない。

従って、本発明は、抗癌剤として使用可能な優れた免疫賦活物質を得ることを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明のスクリーニング方法は、抗癌性物質のスクリーニング方法であって、MIST分子とFgr分子との会合状態を阻害する会合阻害物質を選択することを特徴としている。

10

ここで前記選択は、MIST分子のC末端側プロリンリッチ領域におけるFgr分子の会合を阻害する物質を選択するもの又は、Fgr分子のSH3ドメインにおけるMIST分子の会合を阻害する物質を選択するものであることが好ましい。また、前記会合阻害物質が、MIST分子のC末端側プロリンリッチ領域に結合するアミノ酸であることが好ましい。

【発明の効果】

【0005】

本発明によれば、MIST分子とFgr分子との会合を阻害する会合阻害物質が選択されるので、抗癌剤として使用可能な優れた免疫賦活物質を得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【0006】

本発明のスクリーニング方法は、MIST分子とFgr分子との会合状態を阻害する会合阻害物質を選択することを特徴としている。

MIST分子は、マスト細胞のみならず、IL-2刺激NK細胞にも高発現することが知られている。このようなMIST分子が、Fgr分子との会合することによってNK（ナチュラルキラー）細胞の機能、特に細胞傷害機能及びIFN- γ 産生機能を抑制的に制御していることが、本発明によって見出された。このことは、NK細胞におけるMIST分子とFgr分子との会合状態を阻害すればMIST分子の機能を阻害することになって、NK細胞の免疫賦活的な抗腫瘍活性を高めることができることを意味する。従って、MIST分子とFgr分子との会合状態を阻害する物質を選択することによって、優れた免疫賦活物質を得ることができる。

30

【0007】

MIST (mast cell immunoreceptor signal transducer) 分子は、N末端にリン酸化されるチロシン残基、中央部にプロリンに富む領域（プロリンリッチ領域）、C末端にSH2ドメインを保有し、キナーゼ活性や酵素活性を持たない典型的なアダプター分子であることが知られており、マウスのMIST及びヒトのMISTの配列は既に特定されている（マウスについて配列番号1及び2、ヒトについて配列番号3及び4）。

Fgr分子は、血液細胞に発現するSrc型チロシンキナーゼであり、N末からSH2ドメイン、SH3ドメイン、そしてC末にチロシンキナーゼドメインを持つ(DDBJ/GenBank/EMBL accession number; P14243)。

40

【0008】

本発明における「会合」とは、MIST分子の機能発現のためのシグナリングがMIST分子に生じるように、MIST分子に対して他の分子が接触又は結合することを意味する。このため、不可逆的な化学結合及び物理的な結合のみならず、pH、温度などの条件下で結合・離脱可能な結合も含む。

また「会合状態を阻害する」とは、MIST分子とFgr分子との会合を他の物質を介在させて遮断することのみならず、少なくともいずれか一方の一部を欠落又は破壊すること及び、少なくともいずれか一方の全体の発現を阻止してこれらの分子の会合が生じないようにすることも含まれる。

従って、MIST分子及びFgr分子の会合状態の阻害は、それぞれの分子のタンパク

50

質レベルでのものであってもよく、遺伝子レベルであってもよい。

【0009】

本発明のスクリーニング方法は、MIST分子のC末端側プロリンリッチ領域におけるFgr分子の会合を阻害する物質を選択するものであってもよい。このような選択では、MIST分子のC末端側プロリンリッチ領域に対して特異的に結合可能な分子、例えばこの領域の塩基配列又はアミノ酸配列に対して相補的な配列を有するDNA断片やアミノ酸、低分子を選択することができる。同様にFgr分子のSH3ドメインにおけるMIST分子の会合を阻害する物質を選択するものであってもよく、いずれの性質を有するものであってもよい。MIST分子のC末端側プロリンリッチ領域とFgr分子のSH3領域とは、MIST分子の機能発現に必要な領域であることから、これらの少なくともいずれかに対して、分子の会合状態の阻害を指標とすることにより、抗癌性物質を効果的にスクリーニングすることができる。

【0010】

スクリーニングは、既知のスクリーニング手法に基づいて行うことができる。このようなスクリーニング方法としては、1. 表面プラズモンセンサーを利用した方法、2. 酵母ツー・ハイブリッド(two-hybrid)法を利用した方法、3. 細胞活性化に基づく指標物質を測定する方法が挙げられる。

【0011】

例えば、表面プラズモンセンサーを利用する場合には、センサーチップ上にMISTタンパク質を固定し、次にアナライトとしてFgrタンパク質を注入することにより、MISTとFgr複合体をあらかじめ形成させ、そこに各種候補物質を注入して、センサーチップ上のMIST-Fgr複合体の解離反応を測定することができる。

【0012】

酵母のツー・ハイブリッド法を利用する場合には、Gal4転写因子の転写活性化ドメインとMISTの融合タンパク質ならびにDNA結合ドメインとFgrの融合タンパク質を酵母内で発現させることにより、MISTとFgrの会合・解離をGal4転写因子の標的となるレポーター遺伝子の活性化、例えば栄養要求性やlacZによる発色によって評価できる。この系に特定物質を添加してGal4転写因子の活性化の阻害を指標にMISTとFgrの結合阻害物質をスクリーニングできる。また、転写因子をGal4からVPI6に、レポーター遺伝子をEGFP遺伝子に代えることにより、酵母以外にも、哺乳類細胞を用いたツー・ハイブリッド法で会合阻害物質を探索することも可能である。

【0013】

受容体刺激による細胞活性化に基づいた指標物質の測定方法としては、細胞内カルシウム濃度やIFN- γ 濃度の測定などが挙げられる。細胞内カルシウム濃度やIFN- γ の測定などの細胞活性化の測定は、MIST分子及びFgr分子のいずれかを発現している細胞と、両者を発現している細胞とに対して特定物質を添加し、常法に従って、受容体刺激による細胞活性化を測定することにより行うことができる。このとき、MIST分子あるいはFgr分子を単独で発現している細胞では効果がなく、両者を発現している細胞では細胞内カルシウム濃度の上昇やIFN- γ の産生量に変化する場合、分子間の会合が阻害されたことになるため、このような作用を有する物質を会合阻害物質として認定することができる。

MIST分子あるいはFgr分子を単独で発現している細胞としてはMIST欠損マウス由来のNK細胞、MIST分子及びFgr分子を発現する細胞としては野生型マウスNK細胞などを挙げるができる。また細胞内カルシウム濃度の測定やIFN- γ の測定は、カルシウム蛍光指示薬や抗IFN- γ 抗体の使用を含むこの業界で周知の方法をそのまま用いることができる。

【0014】

これらのスクリーニング方法は、単独で行ってもよいが、これらを適宜組み合わせて行うことが好ましい。この場合には、上記スクリーニング方法の組み合わせ順序について特別制限はないが、細胞活性化に基づく指標物質の測定を含むスクリーニング方法を最後に

用いることが、MISTとFgrの会合阻害と細胞機能の変化に基づいて直接的に選別を行うことができるため、好ましい。

【0015】

本発明のスクリーニング方法によって得られた会合阻害物質は、抗癌剤としての機能を有するものであることが期待できるので、スクリーニングにより得られた物質を、そのまま或いは既知の賦形剤などと併せて、抗癌剤を生成することができる。

またMIST分子とFgr分子との会合状態を分子モデル上で解析し、この会合状態を阻害する分子を設計することによって抗癌作用を有する物質を得ることもできる。或いは、本発明を利用して、既知の抗癌剤の活性評価を行うこともできる。

【実施例】

10

【0016】

[実施例1]

MIST欠損マウスの作製

マウスMIST遺伝子の2番目エクソン（翻訳開始コドンを含む）を含むフラグメントを、E14ES細胞のゲノムDNAを用いてPCRにより得た。

最終ベクターの相同領域は、MIST翻訳開始コドンの直前（上流側）の5.75kbゲノムフラグメントと、2番目エクソンの直後（下流側）の0.85kbのEcoRI-BamHIイントロンDNAフラグメントとで構成されていた。2番目イントロンの5'部分と最初の6アミノ酸をコードする50bpの2番目エクソンとをEFGP-ネオマイシン耐性遺伝子カセットにより置換した。本カセットは、エンハンストグリーンフルオレセントプロテイン（EGFP）cDNA及びSV40のポリAシグナル配列（pEGFP-C1、クローンテック社製）と、pGKneo由来のloxP配列に囲まれたネオマイシン耐性遺伝子とを用いて構築した（図1参照）。

20

【0017】

これらのすべてのフラグメントを、HSVチミジンキナーゼ遺伝子（HSV-TK）を含むpKSTKLokPNeoターゲティングベクターへ組み込んだ。得られたMISTターゲティングコンストラクトを、E14ES細胞へ電気穿孔法により導入し、G418（0.3mg/ml）及びガンシクロビル（0.2μM）を用いて導入細胞のスクリーニングを行った。薬剤耐性コロニーを、PCRによって相同組換え現象についてスクリーニングして、サザンブロット解析によって確認した。ターゲットクローンをC57BL/6の胚盤胞に導入した。

30

【0018】

キメラマウスを得て、その子孫に対してサザンブロット解析を行い、変異体子孫をスクリーニングした。ヘテロ体（MIST^{+/neo}マウス）をBALB/c又はC57BL/6マウスと掛け戻して対照動物を作製した。EGFP蛍光は、挿入ネオマイシン耐性遺伝子カセットによる翻訳のサイレンシングのため、MIST^{+/neo}マウス由来のMIST陽性細胞において検出されなかった。そこで変異相同染色体からネオマイシンセレクションカセットを欠失させるために、オスMIST^{+/neo}マウスと掛け合わせたメスC57BL/6マウス由来の胚盤胞に、pCreepacプラスミドを一時的に導入して、MIST^{+/Dneo}マウスを作製した。BALB/c対照動物について8回掛け戻されたMIST^{+/neo}マウスとC57BL/6対照動物について6回掛け戻されたMIST^{+/Dneo}マウスを用いて、ホモ型マウスを得た。

40

【0019】

[実施例2]

MIST欠損マウスにおける細胞分布

MIST欠損マウスにおける種々の細胞分布を調べるために、各種抗体を使用して、フローサイトメトリーによる解析を行った（図2参照）。

4～6週齢のMIST欠損マウスの胸腺（図2a）、骨髄（図2b）、肝臓（図2c）及び脾臓（図2d）から細胞懸濁液を作製し、各種細胞をフローサイトメトリー（ベクトン・ディッキンソン社製；CELLQuestソフトウェア）を使用して調べた。一次抗

50

体として抗CD18 (2.4G2)、抗TCR $\alpha\beta$ (H57-597)、抗NK1.1 (PK136)、抗CD3 ϵ (145-2C11)、抗B220 (RA3-6B2)、DX-5、抗c-kit、抗CD4、抗CD8 α 、抗Ly49A (A1)、抗Ly49D (4E5)、抗Ly49C/I (5E6)、抗Ly49G2 (4D11)、抗CD94及び2B4 (それぞれ、BDファーマーミゲン社製、サンノゼ、米国; eBioscience社製、サンディエゴ、米国) を使用し、二次抗体としてFITC結合抗体、PE結合抗体、ビオチン結合抗体、ストレプトアビジンPerCP-Cy5.5 (BDファーマーミゲン社製、サンノゼ、米国) を使用した。

【0020】

図2に示されるように、MIST欠損マウスの各臓器におけるB細胞、T細胞、NK細胞及びNKT細胞を含む造血系細胞の分化に異常は認められず、MHCクラスIに対するLy49A、Ly49C/I、Ly49G2、CD94などの抑制受容体並びにLy49Dなどの活性化受容体を発現するNK細胞集団の比率及び各受容体の発現レベルも、野生型マウスと比較して変化は認められなかった。

【0021】

[実施例3]

NK細胞傷害アッセイ

次にMIST欠損マウス細胞について各種腫瘍細胞に対する細胞傷害性について調べた。

標準的な ^{51}Cr 放出アッセイ (通常の4時間) によって細胞傷害性を調べた (J. Exp. Med., (1997) 186; 1957-1963)。簡単に説明すれば、 1×10^6 個の標的細胞を1時間、 $100 \mu\text{Ci}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (アマシャム社製) と共にインキュベートした後、十分に洗った。IL-2 (2000 U/ml) の存在下で5~7日間培養したFACS選別NK細胞 (NK1.1 $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^-$) を、最終容量 $200 \mu\text{L}$ でU底マイクロタイタープレートに2ウェルずつ、標的細胞 (4×10^3 個/ウェル) に加えた。標的細胞には、YAC-1、B16メラノーマ細胞 (順天堂大学の髙部博士より供与) (a) と、Ba/F3細胞及びこの細胞にMHC Vのm157抗原又はRAE1- γ を発現させたトランスフェクタント (千葉大学の荒瀬博士より供与) (b) と、抗NK1.1抗体、抗CD16抗体、抗2B4抗体、抗Ly49D抗体の存在下におけるFc γ R $^+$ のP815 (順天堂大学の髙部博士より供与) 及びP815のみ (c) とした。

【0022】

図3に示されるように、IL-2活性化脾臓NK細胞 (NK1.1 $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^-$) について、野生型 (黒丸) 及びMIST欠損マウス (白丸) とで比較したところ、YAC-1細胞及びB16細胞に対する細胞傷害活性に対する細胞傷害活性 (図3a) と、Ly49H受容体のリガンドであるマウスサイトメガロウイルスのm157抗原や、NKGD2受容体のリガンドであるRAE1- γ を発現させたBa/F3細胞に対する傷害活性 (図3a) とはいずれも、野生型NK細胞と比べて亢進していた。さらに、Fc受容体を発現するP815と各種NK細胞受容体特異的抗体を用いて、個々の受容体を介した細胞傷害活性について解析したが、MIST欠損NK細胞は、いずれの受容体を介した細胞傷害活性も、野生型NK細胞と比較して亢進していた。

【0023】

[実施例4]

MIST欠損NK細胞におけるINF- γ 産生亢進

それぞれ 1×10^5 個のIL-2で刺激した野生型NK細胞 (+/+) とMIST欠損NK細胞 (-/-) とを、抗NK1.1抗体、抗Ly49D抗体で予めコートしたマイクロタイタープレート上で6時間 $2 \mu\text{M}$ のモノニンシ (シグマアルドリッチ社) の存在下で、又はPMA (50 ng/ml) + イオノマイシン ($1 \mu\text{M}$) の存在下でそれぞれ、インキュベートした。細胞を回収後、4%のパラホルムアルデヒドで固定し、 50 mM のNaCl、 5 mM のEDTA、0.02%の NaN_3 及び0.5%のトライトンX-100を含む溶液中で透過性にした。3%のウシ血清アルブミン含有PBSでブロッキング後、

細胞を抗 I N F - γ - P E 抗体 (X M G 1. 2 ; B D P h a r M i n g e n 社製) で染色し、細胞内 I N F - γ についてフローサイトメトリーを用いて調べた。結果を図 4 (A) に示す。

【0024】

また I L - 2 存在下で培養された野生型 N K 細胞 (黒) と M I S T 欠損 N K 細胞 (白) とをそれぞれ 5×10^4 個 / $200 \mu\text{L}$ で、I L - 2 の存在下で平底マイクロタイタープレートで培養し、抗 C D 3 抗体、抗 N K 1. 1 抗体、C D 1 6 抗体、L y 4 9 D 抗体又は 2 B 4 抗体の各固定化抗体で、或いは I L - 1 2 ($10 \text{ ng} / \text{mL}$) で刺激した。次いで、標的細胞 (Y A C - 1 及び B 1 6) を、I L - 2 の存在下で N K 細胞と 1 : 1 の割合で U 底プレート中で、24 時間、同時培養した。培養後、無細胞培養上清を回収して、I F N - γ 及び I L - 4 の量を、E L I S A キット (B i o S o u r c e 社製) を用いて測定した。結果を図 4 (B) に示す。* ; $P < 0.05$ 、** ; $P < 0.01$ 。

10

【0025】

図 4 (A) 及び (B) に示されるように、N K 細胞受容体刺激による I F N - γ 産生を、細胞内染色及び E L I S A で解析した結果、N K 1. 1、L y 4 9 D、C D 1 6、2 B 4 刺激のいずれにおいても、M I S T 欠損 N K 細胞では、野生型よりも有意に高い産生が認められた。以上の結果から、M I S T は、広範な活性化 N K 受容体シグナルを負に制御していることが明らかになった。

【0026】

[実施例 5]

20

M I S T 欠損 N K 細胞における N K 受容体シグナル伝達の増強

M I S T 欠損 N K 細胞に認められる N K 受容体刺激に伴う活性化亢進のメカニズムを解明するために、N K 受容体下流のシグナル伝達について生化学的に解析した。

N K 1. 1 仲介 I F N - γ 産生について、S r c ファミリー P T K 阻害剤である P P 2 又はピセタンノールの存在下で、野生型 N K 細胞と M I S T 欠損 N K 細胞とで比較した。その結果、N K 1. 1 刺激に伴う P L C - γ 2 のチロシンリン酸化の亢進、E R K 2 及び p 3 8 M A P キナーゼの活性化の亢進が観察された。また I F N - γ 産生を指標に、S r c 型チロシンキナーゼ又は S y k / Z A P - 7 0 型チロシンキナーゼの特異的阻害剤により、M I S T の関与するシグナル伝達経路を解析した結果、M I S T 欠損 N K 細胞は、野生型細胞と比較して、S y k / Z A P - 7 0 型チロシンキナーゼ阻害剤に対して高い感受性を示すことから、M I S T 欠損 N K 細胞では、N K 受容体刺激に伴う S y k / Z A P - 7 0 経路の活性化亢進が存在することが示唆された (データ示さず)。

30

【0027】

[実施例 6]

N K 受容体シグナル伝達に関与する M I S T の機能ドメインの同定

N K 受容体シグナル伝達の負の制御に関与する M I S T の機能ドメインを明らかにするために、M I S T 欠損 N K 細胞に、各種 M I S T 機能ドメイン変異体をレトロウィルスベクターを用いて導入した。

マウス野生型 M I S T (W T) と、N 末端側プロリンリッチ領域欠失変異体 (d P R 1) 及び C 末端側プロリンリッチ領域欠失変異体 (d P R 2) の各種変異体の c D N A を、p M X - I R E S - G F P レトロウィルスベクターに挿入した。本レトロウィルスベクターは挿入遺伝子以外に、E G F P を発現するので、遺伝子導入された細胞を E G F P の蛍光を指標に F A C S で解析することができる。得られた各プラスミドを、パッケージ細胞株 P L A T - E に、F u G N E N 6 (ロッシュ社) を用いて導入して、24 時間インキュベートした後に、培養上清を回収して、ウィルスストックとして濃縮した。

40

【0028】

F A C S を用いてソートした N K 細胞又は N K T 細胞を I L - 2 の存在下で 24 時間培養し、 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のポリブレン存在下でレトロウィルスで感染させた。細胞を更に 3 日間、I L - 2 の存在下で培養して、5 日目に抗 N K 1. 1 抗体又は P M A + イオノマイシンによる刺激を 6 時間行って、細胞内 I F N - γ 染色を行った。

50

結果を図5に示す。対照のウィルスを用いたNK細胞（中列2段目）と比較して、野生型のNK細胞ではIFN- γ の産生抑制が認められた（中列3段目）。これに対して、変異型のMISTを導入した場合には、N末端側プロリンリッチ領域を欠失させると部分的なIFN- γ の産生亢進が認められた（中列4段目）のに対して、C末端側プロリンリッチ領域を欠失させると、IFN- γ の産生抑制が認められなかった（中列最下段）

これらのことから、MISTのC末端に存在するプロリンリッチ領域とそこに会合する分子が、NK受容体シグナルを負に制御するために必須であることが明らかになった。

なお、チロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体及び非機能型SH2ドメイン変異体を導入した場合は、野生型MISTを導入した場合と同様に、NK受容体刺激に伴うMIST欠損NK細胞のIFN- γ の産生亢進は、野生型NK細胞レベルまで低下していた（データ示さず）。

【0029】

[実施例7]

MISTのC末端側プロリンリッチ領域に会合する分子の同定

ヒトMISTの1から213番目のアミノ酸残基をベイトとして、ヒトマスト細胞および脾臓に由来するcDNAライブラリーを用いて酵母ツー・ハイブリッド法によりMISTと結合する分子を探索した。その結果、Src型チロシンキナーゼであるFgrが、MIST分子と会合する分子として同定された。

FACSで選別された脾臓NK細胞（NK1.1+TCR $\alpha\beta$ -）とNKT（NK1.1+CD4+）をIL-2で5日間活性化させ、RT-PCR解析に付した。全RNAはTRIzol試薬（BRL）を用いて単離し、次いで、SuperScriptII逆転写酵素をオリゴ（dT）プライマー（Invitrogen）と共に使用して、一本鎖cDNAに転換した。下記のプライマーを使用し、得られたcDNAを、MIST、Fgr又は β -アクチンのmRNAに対するPCRに付した。

【0030】

MISTに対して

5'-CTTACAGAGTGCTCCAGGATGCGACCGTGG-3'（配列番号：5）

5'-GAGGGGTTGGTACTTCTTGGGGAGAGTGATAGC-3'（配列番号：6）

Fgrに対して

5'-TGGTGGGGGAATACCTAATATGCAAGATCG-3'（配列番号：7）

5'-TGCCAGTCAGGCTATGCTGGTCTCCAGG-3'（配列番号：8）

β -アクチンに対して

5'-TACAATGAGCTGCGTGTGGC-3'（配列番号：9）

5'-TAGCTCTTCTCCAGGGAGG-3'（配列番号：10）

【0031】

また、このFgrを、野生型（WT）又はプロリンリッチ領域欠失変異体（dPR1及びdPR2）のいずれか若しくは双方と、COS-7細胞において同時発現させた。細胞溶解物（WCL）に対して、抗MIST抗体を用いた免疫沈降（IP）を行い、抗Fgr抗体（Santa Cruz Biotechnology Inc.社製）又は抗MIST抗体でプロットした

【0032】

その結果、図6a及びbに示されるように、NK細胞ではMIST分子とFgr分子とがRNAレベルで共に発現し、MISTと共に免疫沈降することが明らかとなった。さらに図6cに示されるように、Fgrは、MISTのC末端側プロリンリッチ領域を欠失させると会合できなくなることから、C末端側プロリンリッチ領域にSH3ドメインを介して結合することが示唆された。

【0033】

[実施例8]

MISTとFgrの相互作用に依存したNK細胞活性化の抑制

NK細胞には、MIST及びFgrが共に発現しているが、NKT細胞にはMISTの

みが発現していることが判明した。これを利用して、NK T細胞にF g r分子を異所的に発現させることによってM I S TとF g rとの相互作用のNK細胞受容体刺激によるI F N- γ の産生に与える影響について解析した。

I L-2存在下で培養されたNK T細胞（野生型マウスの細胞）を、M I S TとE G F Pを発現するレトロウィルスで感染させた。5日目に細胞を、抗NK1.1抗体、抗CD3抗体又はPMA+イオノマイシンのそれぞれで6時間刺激し、細胞内I F N- γ の産生について解析した。

その結果、図7に示されるように、F g rを発現しないNK T細胞においてはNK1.1刺激によるI F N- γ の産生はM I S T欠損マウス（-/-）でも野生型マウス（+/+）に比べ亢進しておらず、またF g rを野生型NK T細胞に異所的に発現させるとI F N- γ の産生が低下すること、さらにM I S T欠損NK T細胞では、F g r導入によるI F N- γ 産生の低下が認められないことが判明し、NK細胞受容体シグナルの抑制には、M I S TとF g rの相互作用が必須であることが明らかとなった。

【0034】

〔実施例9〕

M I S T欠損マウスにおける腫瘍肺転移に対する抵抗性の増強

M I S T欠損マウスにおけるNK細胞機能を生体レベルで把握するために、腫瘍細胞の肺転移モデルを用いて検討した。

大腸癌細胞C o l o n-26細胞（ 2.4×10^4 個）及び黒色細胞種B16-BL6（ 2×10^5 個）をそれぞれB A L B/c及びC56BL/6系統のM I S T欠損マウス及び野生型マウスに経静脈投与した。2週間後に肺に転移した腫瘍細胞の結節数を解剖顕微鏡を用いて計測した。

その結果、図8a及び図9に示されるように、いずれの腫瘍細胞投与群においても、M I S T欠損マウス（黒）では野生型マウス（白）に比べて、肺転移結節数の有意な低下が認められた（*； $p < 0.01$ ）。

次いで、NK細胞の除去の影響を調べるために、抗アシアロGM1抗体を2日目、3日目及び8日目に腹腔投与した。NK細胞除去は、処理マウスの脾臓内におけるNK1.1⁺CD3⁺細胞が存在しないことによって確認した。その結果、このようにNK細胞を除去することにより、M I S T欠損マウスにおける転移抵抗性が消失した（図8b参照）。

これらのことから、生体レベルにおいてもM I S T欠損によるNK細胞機能亢進が存在し、抗腫瘍活性の増強に繋がるということが明らかとなった。

【0035】

このように、M I S T分子とF g r分子との会合状態を阻害することによって、M I S T分子の抑制的な機能の発揮が阻害されて、免疫賦活的な抗癌作用が生じることが明らかである。このため、M I S T分子とF g r分子との会合状態を阻害する物質を、種々の手法によってスクリーニングすることにより、抗癌剤として有用な物質を得ることができる。例えば、表面プラズモンセンサーを利用する手法や、酵母のツー・ハイブリッド法を利用する手法、細胞内カルシウム濃度やI F N- γ 濃度を測定する手法を用いて、M I S T分子とF g r分子との会合状態を阻害するか否かを指標として、有用な抗癌物質を容易に得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、本実施例に係るM I S T欠損マウスを作製するために用いられたターゲッティングコンストラクトの構成図である。

【図2】図2は、M I S T欠損マウスの脾臓（a）、骨髄（b）、肝臓（c）及び脾臓（d）における各種の細胞分布を示すフローサイトメトリーの分析図である。

【図3】図3は、M I S T欠損マウス細胞におけるB a/3細胞（a）、B a/3細胞にM H C Vのm157抗原又はR A E1- γ を発現させたトランスフェクタント（b）及びI g Gに対する受容体を発現するP815細胞に各種NK受容体に特異的な抗体を結合させた時の（c）細胞傷害性を比較したグラフである。

10

20

30

40

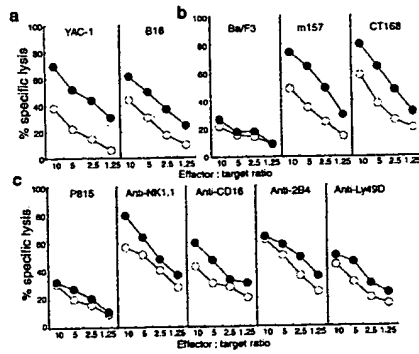
50

【図9】MIST欠損マウス（黒）と野生型マウス（白）における腫瘍肺転移の状態を示す写真である。

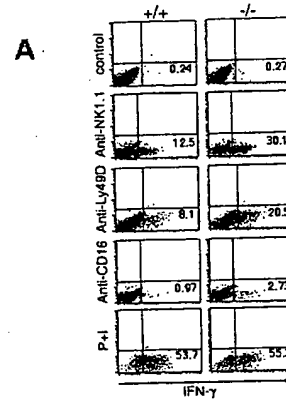
Figure 1 consists of three panels (a, b, c) showing flow cytometry plots for B cell development. Each panel compares $-/-$ and $+/+$ genotypes.

- Panel a:** CD3 vs CD4 staining.
 - $-/-$ genotype: CD3 vs CD4 plot. Percentages: 53 (top-left), 38 (top-right), 52 (bottom-left), 39 (bottom-right).
 - $+/+$ genotype: CD3 vs CD4 plot. Percentages: 76 (top-left), 5 (top-right), 15 (bottom-left), 5 (bottom-right).
- Panel b:** B220 vs IgM staining.
 - $-/-$ genotype: B220 vs IgM plot. Percentages: 44 (top-left), 24 (top-right), 49 (bottom-left), 18 (bottom-right).
 - $+/+$ genotype: B220 vs IgM plot. Percentages: 50 (top-left), 17 (top-right), 50 (bottom-left), 20 (bottom-right).
- Panel c:** TCRβ vs IgM staining.
 - $-/-$ genotype: TCRβ vs IgM plot. Percentages: 13 (top-left), 7 (top-right), 15 (bottom-left), 6 (bottom-right).
 - $+/+$ genotype: TCRβ vs IgM plot. Percentages: 15 (top-left), 7 (top-right), 15 (bottom-left), 6 (bottom-right).

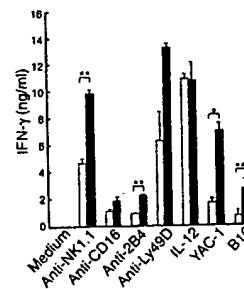
【 図 3 】



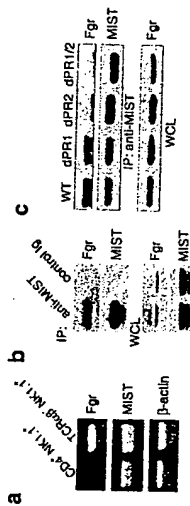
【 図 4 】



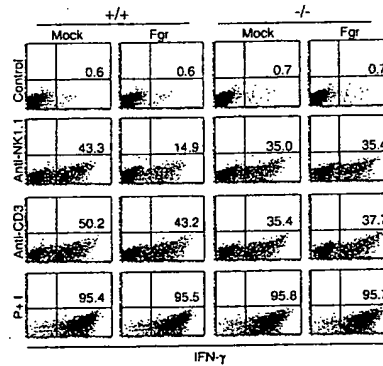
B



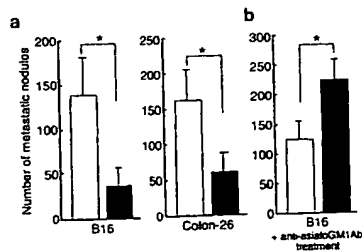
【 図 6 】



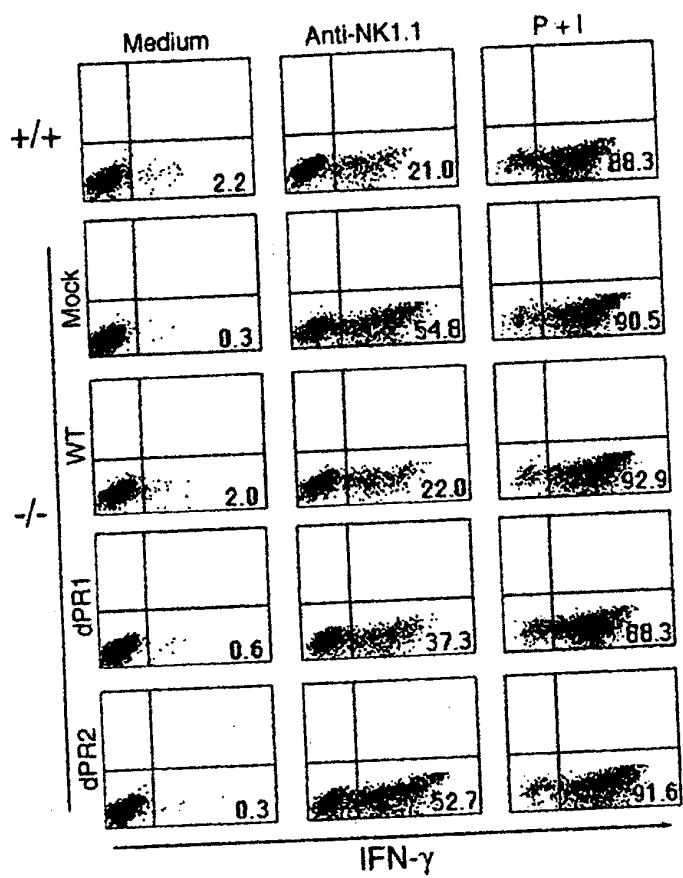
【 図 7 】



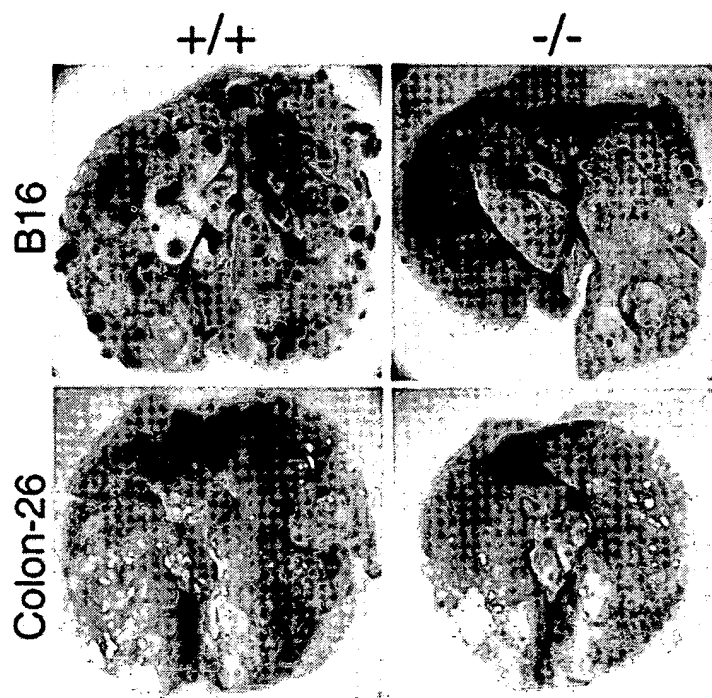
【 図 8 】



【 図 5 】



【図 9】



【配列表】

2005257347000001.app

フロントページの続き

テーマコード (参考)

(51)Int.Cl.⁷

F I

G O 1 N 33/566

G O 1 N 33/53

M

// A 6 1 K 45/00

G O 1 N 33/566

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 35/00

(72)発明者 北村 大介

千葉県野田市西三ヶ尾 4 8 4 - 2 2 5

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02
 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QQ42 QQ53 QQ61 QQ79 QQ89 QR08
 QR32 QR41 QR42 QR50 QR62 QR77 QS25 QS33 QS34 QS36
 QX01
 4C084 AA02 AA17 NA14 ZB262